

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2000-504334

(P2000-504334A)

(43) 公表日 平成12年4月11日 (2000.4.11)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テマコード* (参考)
A 6 1 K 9/127		A 6 1 K 9/127	
47/12		47/12	
47/18		47/18	

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 22 頁)

(21) 出願番号	特願平9-527225	(71) 出願人	シェリング アクチエンゲゼルシャフト
(86) (22) 出願日	平成8年12月20日 (1996.12.20)		ドイツ連邦共和国, デー—13353 ベルリ
(85) 翻訳文提出日	平成10年7月16日 (1998.7.16)		ン, ミュラーシュトラッセ 178
(86) 国際出願番号	P C T / D E 9 6 / 0 2 4 8 8	(72) 発明者	ザクサ, アンドレアス
(87) 国際公開番号	W O 9 7 / 2 8 1 0 4		ドイツ連邦共和国, デー—10589 ベルリ
(87) 国際公開日	平成9年8月7日 (1997.8.7)		ン, ボンホエフェルファ 8
(31) 優先権主張番号	1 9 6 0 4 2 3 0 . 5	(72) 発明者	ハック, ラルフスィグベルト
(32) 優先日	平成8年1月29日 (1996.1.29)		ドイツ連邦共和国, デー—14193 ベルリ
(33) 優先権主張国	ドイツ (D E)		ン, アウグストービクトリアーストラッセ
			110
		(74) 代理人	弁理士 石田 敬 (外4名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 医薬製剤を安定化するための緩衝系

(57) 【要約】

この出願は、生理的適合性を有するアミン及びカルボン酸より成り、薬剤を製造するための新規な緩衝系に関する。

【特許請求の範囲】

1. 少なくとも1つの生理的適合性を有するアミン及び少なくとも1つの生理的適合性を有する有機酸を含有することを特徴とする緩衝液。
2. アミン成分として、2-アミノ-2-(ヒドロキシメチル)-1,3-プロパンジオールを含有することを特徴とする請求項1記載の緩衝液。
3. アミン成分として、N-メチルグルカミンを含有することを特徴とする請求項1記載の緩衝液。
4. 酸成分として、一価もしくは多価のカルボン酸、ヒドロキシカルボン酸、ケト酸、スルホン酸又はアミノ酸を含有することを特徴とする請求項1記載の緩衝液。
5. 酸成分として、安息香酸、コハク酸、マレイン酸、グリコール酸、クエン酸、リンゴ酸、乳酸、 α -ケトグルタル酸、2-[4-(2-ヒドロキシエチル)-1-ピペラジノ]-エタンスルホン酸、グリシン、アスパラギン酸、フェニルアラニン、リシン又はアルギニンを含有することを特徴とする請求項1記載の緩衝液。
6. 2-アミノ-2-(ヒドロキシメチル)-1,3-プロパンジオール及びグリシンを含有することを特徴とする請求項1記載の緩衝液。
7. 2-アミノ-2-(ヒドロキシメチル)-1,3-プロパンジオール及びHEPESを含有することを特徴とする請求項1記載の緩衝液。
8. 2-アミノ-2-(ヒドロキシメチル)-1,3-プロパンジオール及びコハク酸を含有することを特徴とする請求項1記載の緩衝液。
9. 薬剤を製造するための請求項1記載の緩衝液の使用。
10. X線造影剤、MR T用造影剤、放射線診断薬又は放射線治療薬を製造するための請求項1記載の緩衝液の使用。
11. リポソーム懸濁液を製造するための請求項1記載の緩衝液の使用。
12. 造影剤を含有するリポソーム懸濁液を製造するための請求項1記載の緩衝液の使用。

【発明の詳細な説明】

医薬製剤を安定化するための緩衝系

この発明は、製造と保存の期間中において医薬製剤の安定性を高めるための錯化緩衝系について記述する。発明による緩衝混合液は、特殊な性質を有するために腸外での適用に特に適している。なかんずく造影剤溶液を製造するための適性を有する。

技術の現状

薬学上の実務において水溶液製剤の緩衝溶液がよく使用されるが、安定に保存するためにはある一定のpH値が必要である。分解プロセス、例えば、加水分解又は酸化などに、そして溶解度にも、それぞれ異なる最適のpH値があるので、眼科薬、並びに注射及び輸液用水溶液では、生理的pH値7.4に最も近づけるように多くの努力がなされている（＝正常水素イオン濃度）。血漿の緩衝能が大きいために、少なくとも緩衝能が低い注射用溶液（容積 $\leq 20\text{ml}$ ）の場合には、等pH点（＝7.4）からの変位が、かなり大きなpH範囲4～9にわたっても受入れられている（Physikalische Pharmazie, Ed.: H.Stricker, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart, 3 Aufl., 1987）。表1は、薬学的に慣用されている腸外利用の緩衝系をリストアップしたものである（Pharmazeutische Technologie, Eds.: H.Sucker, P.Fuchs und P.Speiser, Georg Thieme Verlag Stuttgart, 1978）。

表1：腸外利用に慣用されている緩衝系

物質 1	物質 2	pH 範囲	最大緩衝能を示す pH
酢酸ナトリウム	酢酸	3.8～5.6	4.7
リン酸二水素ナトリウム	リン酸水素二ナトリウム	5～8	6.8
グリシン	水酸化ナトリウム	8.6～12.8	11.2
クエン酸	リン酸二ナトリウム	2.2～7.8	約 5
トロメタモール	塩酸	7.2～9.0	約 8

腸外利用の重要な医薬グループにはヨウ素を含むX線造影剤があり、多くは輸液用溶液として使用される。ここで緩衝物質として、表1にトロメタモール〔トリス（ヒドロキシメチル）アミノメタン、2-アミノ-2-（ヒドロキシメチル）-1,3-プロパンジオール〕（例えば、ウルトラビスト（商標）、オムニパーク（商標）又はソルトラスト（商標）に含まれる）及びリン酸二水素ナトリウム（例えば、コンレイ（商標）に含まれる）を挙げるが、このほかに、例えば、炭酸水素ナトリウム（例えば、イソビスト（商標）に含まれる）も使用される。pH範囲 7.2~9.0 において緩衝作用がよく、それと共に等 pH 点の調節に広範な可能性が得られることに基づいて、トロメタモール緩衝液（＝トリス）は、ここでは特別な位置づけを得ている。pH 5~8 の範囲にわたり使用されるリン酸塩緩衝液と比較すると、そのほかにトロメタモール緩衝液について、ガラス製の1次容器からのイオンと沈澱をつくる可能性を問題にしている記述はない。

ドイツ特許 DE 2926850 が記載する範囲に、ヨウ素を含む特殊な造影剤溶液の製造乃至は殺菌方法があるが、これは、アミン緩衝液

の pH 値が、温度に依存して低下することに基づいている。トロメタモール緩衝液又はメグルミン緩衝液（pH 7.0~7.6）の pH 値が、殺菌の間に 3.5~5.5 まで下がる結果として、製造中のヨウ化物の生成を明らかに減少させることができた。引き続いて殺菌を行うと該溶液の pH 値は再びほぼ出発点の値に復帰する。

慣用される X 線造影剤（RKM）は、室温（15~25℃）で保存し、光を遮断すると多くは3年を超えて安定である。それ以上に製品の保存期間を延長することは、分解プロセスのために出来なくなることが多い。これらの物質群について記載されるような不安定化反応が起きると、それに伴って pH 値と色が変化し、そして活性物質の含有量が減少する。このような RKM の化学分解に対するインジケータとして、ヨウ化物と遊離アミンの含有量が考慮される（Kontrastmittel, Ed.: U. Speck, Springer-Verlag Berlin, 3. Aufl., 1991）。

従って、この発明の課題は、生理範囲で良好な緩衝作用を有する新規な緩衝系を使用に供し、薬学調剤を保存し、製造するときに、とくに熱殺菌の際に、医薬

の分解反応を減少させることにある。

この課題は、特許請求の範囲に特徴づけられるように発明による緩衝系によって解決される。

本発明による緩衝水溶液系は、生理的適合性を有するアミン及び生理的適合性を有する脂肪族又は芳香族有機酸から成る混合物に係わる。

生理的適合性のあるアミン乃至は酸とは、医薬乃至は医薬用添加剤として既に許可され、又は生理条件のもとでヒト又は動物の有機体の中に存在するような物質であると解釈される。

本発明による緩衝液混合物のアミン成分としては、生理的適合性を示すあらゆるアミンが考慮される。N-メチルグルカミン（メグ

ルミン）及び／又はトロメタモール（2-アミノ-2-（ヒドロキシメチル）-1, 3-プロパンジオール、トリス）が好ましくは使用され、とくにトロメタモールが優れている。

本発明による緩衝液混合物の酸成分としては、一価乃至は多価のカルボン酸（例えば、コハク酸、マレイン酸、安息香酸）、ヒドロキシカルボン酸（例えば、グリコール酸、クエン酸、リンゴ酸又は乳酸）、ケト酸（例えば、 α -ケトグルタル酸）又はスルホン酸（例えば、2-〔4-（2-ヒドロキシエチル）-1-ピペラジノ〕-エタンスルホン酸（HEPES））及びアミノ酸（例えば、グリシン、アスパラギン酸、フェニルアラニン、リシン、アルギニン、とくに天然産のL-アミノ酸を優先する）又はそれらの塩が使用される。とくに優先される場合には、例えば、トロメタモールにコハク酸を複合させる。発明の緩衝液混合物において使用される成分は、任意のモル分率で混合してよい。標準的なモル混合分率1：1（例えば、10 mMトリスと10 mMグリシン）のほかに、さらに混合分率を拡げて1：99から99：1の間で調節することもできる。混合分率を25：75及び75：25にすると非常に好結果が得られる幾つかの例がある。

本発明による緩衝液混合物のpH値を調節するために、例えば、カセイソーダ又は塩酸のような専門家に慣用される物質のほかに、例えば、緩衝液の主成分の塩も使用される。

本発明の緩衝液は、 pH 4 ~ 9 の範囲で十分な緩衝能を示すために、それぞれの医薬製剤について生理的な要求事項を考慮しながら、とくに適する場合には、安定化に必要な最低な pH 値に合わせることが可能になる。従来のトロメタモール緩衝液は、ほぼ 7.2 から 9.0 の pH 範囲だけで十分な緩衝能を示したが、これに対して本発明の緩衝系は、必要に応じ、場合によっては更に低い pH 範囲まで

有効に使用することができる。そのほかにも本発明の緩衝系は、その特殊な物理的及び化学的性質に基づいて、等 pH 点 (約 7.4) の範囲でも従来の緩衝系より優れていることが実証される。従って本発明の緩衝液を使用することによって、その他の条件が等しいときに起こる分解プロセスを、しばしば避けることができる。そのほかにも発明の緩衝液混合物を使用すると、例えば、錯体形成剤 (例えば、エデト酸ナトリウムカルシウム) のような製剤助剤を、部分的に追加しなくても済むが、これは、本発明の緩衝液混合物が、とくに適した場合には自身が錯体として働くからである。これに加えて発明の製剤がもつ長所は、微生物による被害も、1 次容器からのイオンとの沈澱反応も発生しないことにある。さらに発明の製剤には、とくに優れた適合性が顕著に示される。

本発明による非経腸剤 (注射及び輸液用溶液) は、およそ pH 値が 4 ~ 9 乃至は 5 ~ 8 に調節される。しかし、特別な場合には、目指す pH 値は、6.0 ~ 8.0 又は 5.0 ~ 6.7 である。

本発明の緩衝液混合物は、 pH 値に関して明白な温度依存性を示している。驚くべきことには、本発明による緩衝液混合物の pH 値が、温度に依存して降下するときの傾斜が、出発点 pH に明らかに関係することが示された。特別な場合には、本発明による製剤の pH 値は、熱殺菌 (121℃、20分) の間に降下するが、その値は、 pH 単位で 0.5 を超えるか、乃至は 1 ~ 3 である。特殊な医薬剤について発明の緩衝系を、目的によって選ぶことにより、殺菌中に起こる pH の降下範囲と、それと共に場合によって発生する分解反応を制御することができる。特定の場合には、殺菌中に起きる特殊な分解プロセスを回避することを考慮すると、 pH 降下をさらに少なくすることが望まれる。

本発明の製剤を製造するとき、通例のオスモル濃度は、200 ~ 12

00 mOsm/kg又は 200~1000 mOsm/kg、あるいは特に好ましくは 250と 850 mOsm/kgに間に設定される。

本発明の緩衝系が特徴とすることは、一般に、総濃度を低くして、2~40mMの範囲で、しかし、好ましくは10~20 mM又は 5~15mMを使用することにある。

本発明の緩衝系は、特別な方式で造影剤の安定化、とりわけヨウ素を含む芳香族物質を基盤としたX線造影剤の安定化に適している。ここで効果を発揮するのは、一つには製造時の安定化であり、これは、一部には殺菌過程でのpH降下だけに帰せられる。トロメタモール緩衝液(pH 7.5)と比較して、例えば、発明のトロメタモール/グリシン緩衝液(pH 7.5)を使用し、イオプロミド溶液(ヨウ素 300 mg/ml)の中で殺菌(121℃、20分)を、1回、そして繰り返して行ったときに、ヨウ化物の生成が明らかに減少することが証明された。出発点pHにおいて発明の緩衝液が示す温度依存性のpHは、トロメタモール/HCl緩衝液に対して比較すると僅かだけ降下しているだけに、この事実は驚異的であった。同じような結果を、トロメタモール/コハク酸緩衝液又はトロメタモール/HEPES緩衝液(pH 7.5)を使用して得ることができた。

十分な緩衝能を保ちながら7.0未満のpH値を調節する可能性が得られたことにより、発明の緩衝系は、そのほかに製造時の安定性をさらに強めることが許容される。例えば、イオプロミド溶液(ヨウ素 300 mg/ml)のpH値を、本発明のトロメタモール/コハク酸緩衝液の中でpH 6.5に調節すると、比較対象のトロメタモール緩衝液に比べて、殺菌(20分、121℃)の間に生成するヨウ化物が、さらに驚異的に減少する結果が得られた。この効果は、殺菌時間をさらに長くすると顕著に起こったために、本発明の緩衝系は、とくに適する場合には、X線造影剤溶液の繰り返し殺菌にも使用す

ることができる。

本発明の緩衝系が、従来から使用されている緩衝液に対し特に優れている点は、とりもなおさず保存時のX線造影剤溶液の安定性をさらに高めることにある。本発明の緩衝系を使用すると、分解反応が少なくなるので、使用期間は、通例と

して3年を超え、それも主として4～6年乃至は5～10年に達する。該溶液の安定性をみる特別な尺度として、ここでは専門家に知られるパラメータ（例えば、pH値及び溶液の色）の他にヨウ素の含有量、そして特別な場合には遊離アミンの含有量が考慮される。このようにすると、例えば、X線造影剤溶液（濃度：ヨウ素 300 mg/ml）のヨウ素含有量は、総保存期間（使用期間）を通じて $75 \mu\text{g/ml}$ 未満、それも主として $50 \sim 30 \mu\text{g/ml}$ 未満に抑えられる。

X線造影剤溶液の出発pH値に依存して、とくに適切な場合には、発明の緩衝液を使用すると、さらに保存中のアミン生成が減少する結果に至る。該溶液（例えば、ヨウ素 300mg/ml）が含有する遊離アミンは、通例、使用期間中に0.3 %未満、それも主として 0.1又は 0.05 %未満にある。

高めの温度（40℃）において既に3月の保存期間が過ぎると、このように特に適切な場合には、本発明の緩衝液を用いて製造したX線造影剤溶液（イオプロミド）は、トロメタモール緩衝液（出発点pH値=7.5 及び 6.5）に比べてヨウ化物が明らかに減少していることが証明された。さらに出発点pH値に依存して部分的にアミン含有量が、わずかに減少していることが確認された。そのほかに示された驚くべき結果は、発明の緩衝液が存在すると造影剤試験溶液の中で錯体形成剤（エデト酸ナトリウムカルシウム）の減少量が明らかに少なくなる幾つかのケースであった。この事実によって、本発明の緩衝液を、X線造影剤溶液の製造に使用すると、添加する

錯体形成剤を大きく減らすか、乃至はすべて除去するような強い可能性が開かれる。

本発明の緩衝液は、前記の性質によって特に腸外に使用され、放射線診断で一般に知られる親水性のX線造影剤の安定化に適している。まず一度、これに属するX線造影剤を挙げると、例えば、アミドトリゾ酸塩、メトリゾ酸塩、イオプロミド、N、N' -ビス（2、3 -ジヒドロキシプロピル） - 5 - ヒドロキシアセチルアミノ - 2、4、6 - トリヨード - N - メチルイソフタルアミド、イオヘキソール、イオパミドール、イオシミド、イオベルソール、イオメプロール、イオペントール、イオキシラン、イオビトリドール、イオクサグラート、イオトロラ

ン、N、N' -ビス〔3-カルバモイル-5-(2,3-ジヒドロキシプロピルカルバモイル)-2,4,6-トリヨードフェニル〕-N、N' -ビス(2,3-ジヒドロキシプロピル)-マロンアミド及びイオジクサノールがあり、これらは、一部、コンピュータ断層撮影法(CT)にも使用される。このときX線造影剤をリポソームでカプセル化してもよい。

そのほかに発明の緩衝系は、特別な場合において、適用方法(例えば、腸外、経口、局所(眼科薬も含む))とは無関係に、他の医薬剤水溶液乃至は懸濁液(例えば、結晶懸濁液、リポソーム、マイクロ粒子又はナノ粒子、乃至はマイクロカプセル又はナノカプセル)にも使用される。ここにその例を限定しないで挙げると、例えば、Gd-DTPA、Gd-EOB-DTPA、Gd-DOTA、Gd-BOPTA、Mn-DPDP、ガドブトロールなどのMR T造影剤、又は超音波造影剤のほかに、とくに治療用活性物質として、例えば、鎮痛剤/消炎剤、抗生物質、細胞増殖抑制剤及びウイルス抑制剤などがある。これらの活性物質グループもリポソーム製剤として提示することができる。

施行上の実施例：

次の実施例は、本発明の対象物を説明するが、これを実施例に限定するものではない。

実施例1：トロメタモール/HCl緩衝液を用いたイオプロミド溶液の安定性

ヨウ素濃度 300 mg/mlを有し、トロメタモール (20 mM) 緩衝液を用いたイオプロミド溶液 (HClによりpHを、ほぼ7.5又は6.5に調節)を製造し、この溶液の分取を、10 mlの注射用閉筒内で表に挙げた時間だけオートクレーブ処理した(121℃)。このようにして得られた試料について、pH、ヨウ化物含有量及びアミン含有量(遊離の芳香族アミン)の試験を行った。

出発点 pH 値	殺菌時間 〔分〕	pH 変化	ヨウ化物 含有量 〔 $\mu\text{g/ml}$ 〕	アミン 含有量 〔重量％〕
7.5	20	-0.10	8.9	0.019
	60	-0.12	9.5	0.025
	180	-0.18	11.9	0.055
6.5	20	-0.15	8.9	0.010
	60	-0.18	8.7	0.011
	180	-0.22	10.2	0.017

実施例 2 : グリシン (10 mM) / トリス (10 mM) 緩衝液を用いたイオプロミド溶液
の安定性

pH 値を (7.5 と 6.5) に調節した後にグリシン (10 mM) / トリス (10 mM) 緩衝液を用いた 2 つのイオプロミド溶液 (ヨウ素 300mg/ml) を、実施例 1 と同様にして表に挙げた時間だけオートクレーブ処理した (121℃)。試料について、pH、ヨウ化物含有量及びアミン含有量 (遊離の芳香族アミン) の試験を行った。

pH 値	殺菌時間 〔分〕	pH 変化	ヨウ化物 含有量 〔 $\mu\text{g/ml}$ 〕	アミン 含有量 〔重量％〕
7.5	20	-0.11	5.1	0.016
	60	-0.13	5.5	0.029
6.5	20	-0.17	6.3	0.010
	60	-0.23	6.5	0.012

実施例 3 : コハク酸 (10 mM) / トリス (10 mM) 緩衝液を用いたイオプロミド溶液
の安定性

この試験は、実施例 2 と同様にして行った。

p H 値	殺菌時間 〔分〕	p H 変化	ヨウ化物 含有量 〔 μ g/ml〕	アミン 含有量 〔重量%〕
7.5	20	-0.16	1.8	0.021
	60	-0.22	3.6	0.050
6.5	20	-0.17	0.9	0.021
	60	-0.24	1.9	0.033

実施例4：H E P E S (10 mM) / トリス (10 mM) 緩衝液を用いたイオプロミド溶
液の安定性

この試験は、実施例2と同様にして行った。

p H 値	殺菌時間 〔分〕	p H 変化	ヨウ化物 含有量 〔 μ g/ml〕	アミン 含有量 〔重量%〕
7.5	20	-0.09	2.3	0.020
	60	-0.17	5.4	0.049
6.5	20	-0.06	6.2	0.008
	60	-0.11	6.8	0.013

実施例5：グリシン (20 mM) 緩衝液を用いたイオプロミド溶液の安定性

p H値を(約 7.5と 6.5)に調節した後に、グリシン (20 mM) 緩衝液を用いた2つのイオプロミド溶液(ヨウ素 300mg/ml)を、実施例1と同様にして処理した。

出発点 pH値	殺菌時間 〔分〕	pH変化	ヨウ化物 含有量 〔 $\mu\text{g/ml}$ 〕	アミン 含有量 〔重量％〕
7.5	20	-0.24	2.2	0.025
	60	-0.33	4.0	0.048
	180	-0.68	7.2	0.092
6.5	20	-0.38	1.0	0.010
	60	-0.66	1.4	0.013
	180	-0.89	2.3	0.021

実施例6：コハク酸（20 mM）緩衝液を用いたイオプロミド溶液の安定性

この試験は、実施例5と同様に行った。

出発点 pH値	殺菌時間 〔分〕	pH変化	ヨウ化物 含有量 〔 $\mu\text{g/ml}$ 〕	アミン 含有量 〔重量％〕
7.5	20	-0.27	2.9	0.056
	60	-0.63	7.2	0.145
	180	-1.07	16.6	0.348
6.5	20	-0.16	1.4	0.034
	60	-0.25	4.4	0.092
	180	-0.40	11.6	0.229

実施例7：トロメタモール緩衝液のpH値の温度依存性

20 mM のトロメタモール溶液を、0.1 N 塩酸を用いて pH 7.5に調節し、その pHの温度依存性を、Knick 社製の pHメータ 761を使用して、温度補正乃至は温度補償の有り無しで求めた。その結果を、図1に図示する。

実施例8：種々の緩衝液 pH値の温度依存性

種々の緩衝水溶液（それぞれの緩衝剤組成を 10 mMとする）を製造して、pHの温度依存性を、Knick 社製の pHメータ 761を使用して求めた。そのつど緩衝液の温度を、外式センサ Pt-100 により測定し、それに相応して pHメータの温度を補正する。その結果を、図2及び3に図示する。

実施例9：種々の緩衝液によるイオプロミド溶液の3ヵ月における安定性

実施例1及び2と同様にして製造した、緩衝液を含むイオプロミド溶液（ヨウ素 300mg/ml）を、まず 10 mlの注射筒内でオートクレーブ処理（20分、121℃）して、引き続いて40℃において空調装置内に3ヶ月にわたり放置する。これに並行して出発点pH値（殺菌前）を7.5乃至は6.5に調節しておいた溶液を貯蔵した。このようにして得られた試料について、ヨウ化物、アミン（遊離の芳香族アミン）及びエデト酸ナトリウムカルシウムの含有量を試験した。

緩衝系 pH = 7.5	ヨウ化物 [μg/ml]	アミン [重量%]	エデト酸 ナトリウム カルシウム [μg/ml]
トロメタモール	11.8	0.062	90.8
トロメタモール/ グリシン	8.2	0.058	92.7
トロメタモール/ コハク酸	2.6	0.048	93.7
トロメタモール/ H E P E S	6.6	0.070	94.2

緩衝系 pH = 6.5	ヨウ化物 [μg/ml]	アミン [重量%]	エデト酸 ナトリウム カルシウム [μg/ml]
トロメタモール	8.6	0.014	89.9
トロメタモール/ グリシン	7.1	0.015	89.0
トロメタモール/ コハク酸	1.4	0.024	93.7
トロメタモール/ H E P E S	7.1	0.014	90.9

X線造影剤溶液の安定性は、pH≤6.5の領域で純粋なトロメタモール緩衝液によって既に改良されていたことが示された。しかしながら、発明の緩衝液を使用するとなお広い範囲に安定化することができた。この事実は、とくにトロメタ

モールとコハク酸の組み合わせに認められる。

実施例 10：種々の緩衝液の緩衝能

種々の緩衝液の緩衝能は図4に図示される。

実施例 11：緩衝液を使用したブラシーボリポソームの安定性

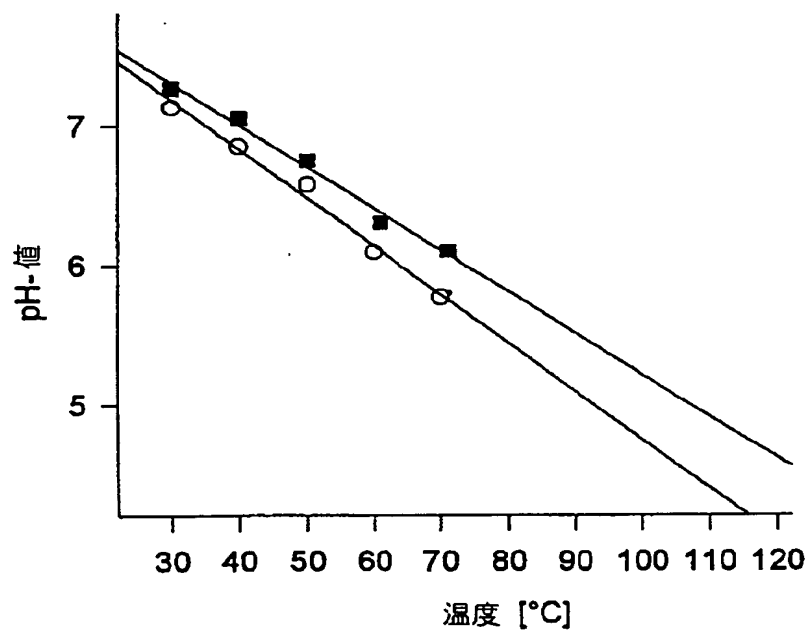
ダイズホスファチジルコリン (150 mg/ml) からなるブラシーボ

リポソーム溶液を、連続式高圧押出し（5経路について 0.8/0.6/0.4及び 0.2 μ mのポリカーボネート膜フィルター板を使用）を用いて種々の緩衝系（pH 6.5に調節）の使用のもとに製造し、この懸濁液の分取を、10 mlの注射用閉筒内で表に挙げた時間だけオートクレーブ処理した（121℃）。このようにして得られた試料について、粒子サイズ（光子相関分光法）及びリゾホスファチジルコリンの含有量を調べた（HPLC法）。

緩衝液	殺菌時間 〔分〕	平均直径 〔nm〕	L P C 含有量 〔mg/g〕
20 mM クエン酸／NaOH	0	161	1.7
	20	154	2.5
	60	161	3.3
20 mM リン酸塩緩衝液 （図1参照）	0	164	1.5
	20	165	2.0
	60	160	3.5
10 mM トリス／ 10 mM コハク酸	0	154	0.7
	20	157	0.9
	60	158	1.2
10 mM トリス／ 10 mM グリシン	0	159	0.6
	20	153	0.9
	60	154	1.3

【図1】

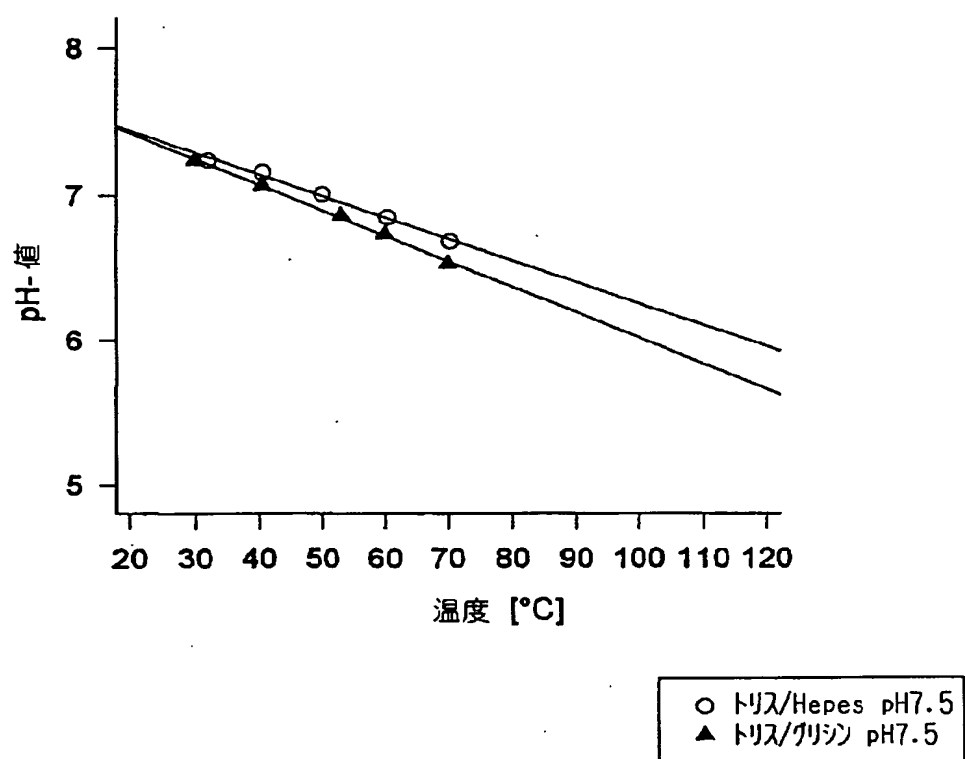
Figur 1 / 4:



○ 温度補償無しで測定
■ 温度補償有りで測定

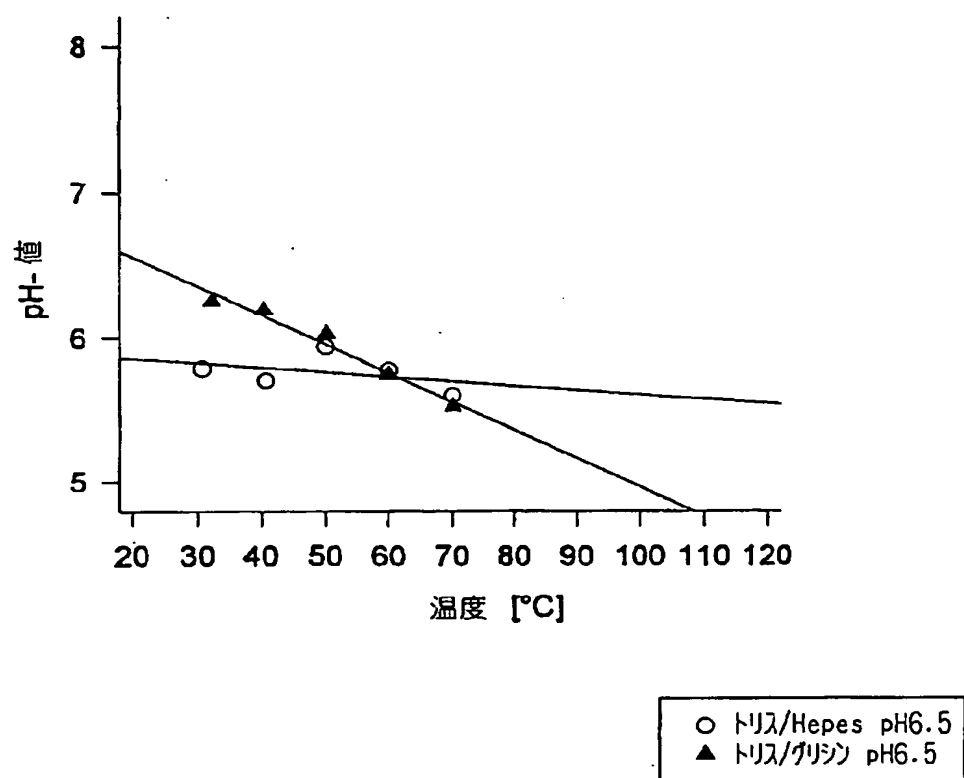
【図2】

Figur 2 / 4:



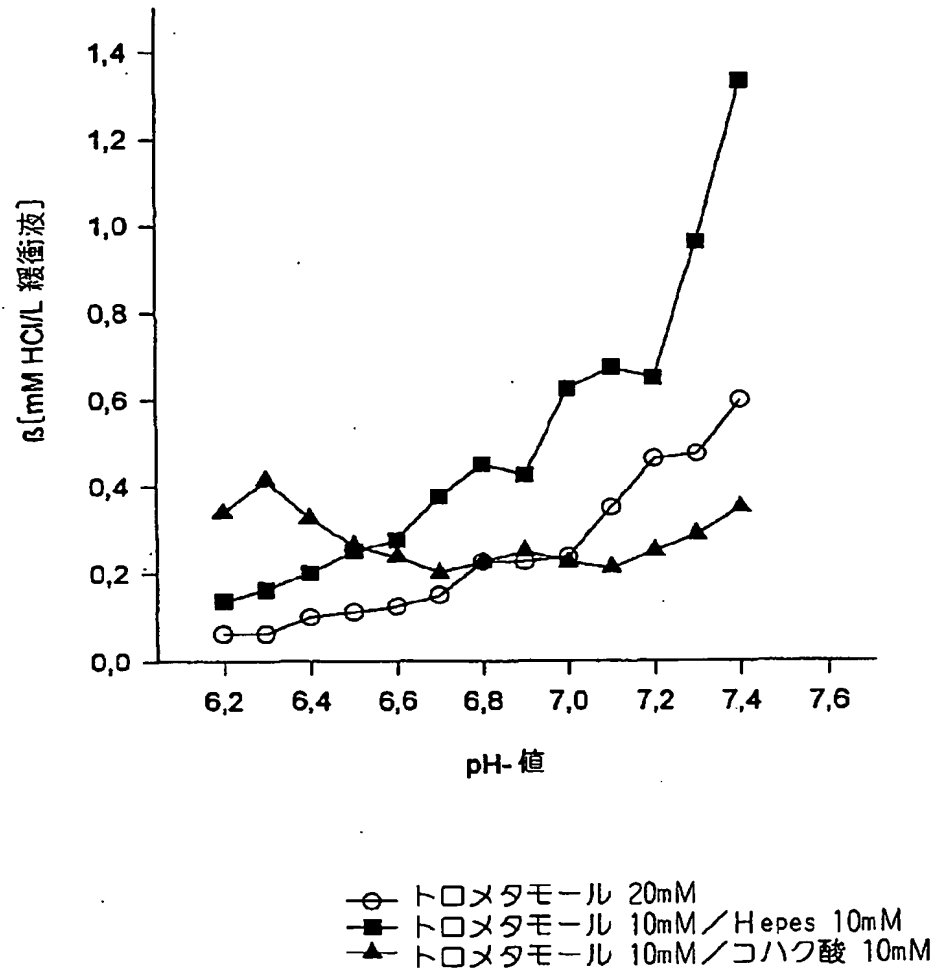
【図3】

Figur 3 / 4:



【図4】

Figur 4 / 4:



【国際調査報告】

REVISED VERSION		INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/DE 96/02488	
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 6 A61K47/02 A61K47/06					
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC					
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 6 A61K					
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched					
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)					
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT					
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages				Relevant to claim No.
X	A. M. KAKAKIOS; ET AL: "Effect of Locally Administered Heparins on Delayed-Type Hypersensitivity Reactions" INT. ARCH. ALLERGY APPL. IMMUNOL., vol. 93, no. 4, 1990, BASEL (CH), pages 300-7, XP000677161 see the whole document ---				18,28
X	WO 94 14478 A (DIBRA SPA) 7 July 1994 see claims 1,4,6-10 --- -/--				20-25, 28-32
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.					
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. "A" document member of the same patent family					
Date of the actual completion of the international search 18 July 1997			Date of mailing of the international search report 08.09.97		
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.O. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl. Fax (+31-70) 340-3016			Authorized officer VENTURA AMAT, A		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. Patent Application No.
PCT/DE 96/02488

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 91 13636 A (NYCOMED AS) 19 September 1991 see claims 1,8-11 see page 10, line 24 - line 30 see page 13, line 1 - line 10 see page 13, line 19 - line 28 see page 15; example 1 see page 16; example 2 ---	20-25, 28-32
X	DE 41 21 568 A (SCHERING AG) 29 October 1992 see claims 1-4 see column 3, line 32 - line 39 see column 3, line 44 - line 51 -----	20-26, 30-32

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
 Information on patent family members

 International Application No.
 PCT/DE 96/02488

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9414478 A	07-07-94	IT 1256248 B	29-11-95
		AU 5833294 A	19-07-94
		CA 2152480 A	07-07-94
		CN 1100329 A	22-03-95
		CZ 9501655 A	13-12-95
		DE 675738 T	29-02-96
		EP 0675738 A	11-10-95
		ES 2077554 T	01-12-95
		FI 953124 A	22-06-95
		HU 72304 A	29-04-96
		JP 8505134 T	04-06-96
		NO 952533 A	16-08-95
		PL 309395 A	02-10-95
		ZA 9309666 A	29-08-94
WO 9113636 A	19-09-91	AT 141519 T	15-09-96
		AU 645544 B	20-01-94
		AU 7345191 A	10-10-91
		CA 2076861 A	10-09-91
		CN 1056058 A	13-11-91
		CS 9100619 A	15-09-91
		DE 69121562 D	26-09-96
		DE 69121562 T	16-01-97
		EG 19889 A	31-03-96
		EP 0521880 A	13-01-93
		ES 2090315 T	16-10-96
		IL 97455 A	27-11-95
		JP 5504953 T	29-07-93
		LT 1591 A, B	26-06-95
		LV 10058 B	20-10-94
		OA 9667 A	15-05-93
		TR 25738 A	01-09-93
		US 5328680 A	12-07-94
DE 4121568 A	29-10-92	CA 2077712 A	30-12-93
		EP 0576740 A	05-01-94
		JP 6009435 A	18-01-94
		US 5592940 A	14-01-97
		US 5450847 A	19-09-95

フロントページの続き

(81)指定国 EP(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP(KE, LS, MW, SD, SZ, UG), UA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), AL, AM, AU, AZ, BB, BG, BR, BY, CA, CN, CZ, EE, GE, HU, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LK, LR, LS, LT, LV, MD, MG, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, RO, RU, SD, SG, SI, SK, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN

(72)発明者 ロシング, ゲオルグ

ドイツ連邦共和国, デー13465 ベルリン,
オラニエンブルジョア, ショーセ 60
ツェー

(72)発明者 ゴリツ, デトレフ

ドイツ連邦共和国, デー13591 ベルリン,
ウォルフショースト 45

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.